

© Топчий И. И., Кондаков И. И., Кириенко А. Н., Щенявская Е. Н., 2011

УДК 616.61.002.234-092:611.13/16-018.74:616.132:599.323.4

И. И. ТОПЧИЙ¹, И. И. КОНДАКОВ², А. Н. КИРИЕНКО¹, Е. Н. ЩЕНЯВСКАЯ¹
МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОТЕЛИЯ АОРТЫ КРЫС
ПРИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

I. I. TOPCHII, I. I. KONDAKOV, O. M. KIRIENKO, E. N. SHCHENJAVSKAJA
THE MORFOMETRIC CHARACTERISTIC OF ENDOTHELIAL RATS CELLS
WITH ACUTE RENAL FAILURE

ГУ «Институт терапии им. Л. Т. Малой НАМН Украины¹;
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины²

Ключові слова: модель гострої ниркової недостатності, показники функціонального стану нирок, морфометричні характеристики, ендотелій аорти щурів, атеросклероз.

Резюме. В статті на моделі гострої ниркової недостатності, викликаній токсичними дозами глицеролу, розглядаються морфологічні ознаки початкових проявів пошкодження ендотелію. Так, у щурів з ознаками глицеролової уремії спостерігаються ранні порушення проліферативного стану ендотелію і множинні дефекти у вигляді стигмат і кратерів у препаратах, зменшення кількості клітин з малою суміжністю. Слід вважати, що порушення структури і проникності ендотелію, які мають місце при гострій нирковій недостатності, можуть бути пусковим чинником в розвитку атеросклерозу.

Keywords: model of sharp kidney insufficiency, indexes of the functional state of kidneys, morfometric description, endothelium of aorta of rats, atherosclerosis.

Summary: In the article on the model of the acute renal failure caused by the toxic doses of glycerol, the morphological signs of initial displays of damage of endothelium, are considered. So, at rats with the signs of glycerol uremia there are early violations of the proliferative state of endothelium and plural morfometric defects in a kind stigmat and craters in preparations, reduction of quantity of cells with small contiguity. Presumably, taking place at acute renal failure of structure violation and permeability of endothelium can be a starting factor in development of atherosclerosis.

Сердечно-сосудистая болезнь широко распространена среди пациентов с хронической

болезнью почек (ХБП) и является ведущей причиной смерти в этой популяции. ХБП, включая более чем 300 000 пациентов на диализе и приблизительно 150 000 человек с почечным трансплантатом, установлена у 13 % американской популяции [10]. В Европе распространенность ХБП подобна таковой в Соединенных Штатах - у 5-7% европейской популяции установлена

Топчий Іван Іванович
Тел. 057 3739031
e-mail: itopchiy@yandex.ru

хроническая болезнь почек I стадии, по сравнению с 6,3 % американской популяции. Кроме того, у 5,5% населения Европы и 4,6% Америки диагностирована ХБП 3 или 4 стадии [11]. При ХБП у пациентов установлен увеличенный риск сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) по сравнению с общей популяцией. Частично высокая заболеваемость и летальность от ССЗ отражают факт, что артериальная гипертензия и диабет, признанные как главные факторы риска ССЗ, являются ведущей причиной и хронической болезни почек [8]. Хотя традиционные факторы риска, включая артериальную гипертензию, сахарный диабет, ожирение, дислипидемию и курение табака также распространены у пациентов СКД, они составляют не весь риск. Независимо от этиологии ХБП, сама уремия несет увеличение риска связанной с ССЗ смертности - даже умеренные снижения скорости клубочковой фильтрации связаны с увеличенным риском сердечно-сосудистого события, госпитализации и смерти [13]. Однако, до настоящего времени немного известно о том, какие изменения структуры эндотелия при становлении ХБП имеют значение для развития атеросклероза у таких больных. В клинических условиях определить самые первые изменения строения эндотелия при развитии болезни почек весьма затруднительно. В связи с этим, нами было проведено экспериментальное исследование на животных, чтобы установить, как острое нарушение функции почек влияет на морфологическую структуру эндотелия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили 14 белых беспородных крыс самцов, весом 200 - 300 г., возрастом 4 месяца. Животные были распределены на 2 группы : группа контроля и группа животных с моделью острой почечной недостаточности (ОПН). Для моделирования ОПН крыс 2-й группы выдерживали 24 часа без пищи, после чего внутримышечно вводили 50% водный раствор глицерола в дозе 10 мл на кг массы тела [1]. Животных помещали в обменные клетки и

собирали мочу в условиях спонтанного диуреза в течение суток, в пробах мочи и крови определяли уровень креатинина. Рассчитывали скорость клубочковой фильтрации (СКФ) [5].

Через 14 суток после введения глицерола животных контрольной и экспериментальной групп подгрупп подвергали эвтаназии в соответствии с Директивой 86/609 ЕЕС и соглашением Совета Европы ETS 123, все эксперименты проводились в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов над животными», одобренными Первым национальным конгрессом по биоэтике (20 сентября 2001 г., Киев) и согласно с «Правилами использования лабораторных экспериментальных животных» (1984, приложение 4). Для морфологического исследования эндотелия кусочки грудного отдела аорты, которая была выделена от дуги до бифуркации на бедренные артерии, перфузировали раствором глюкозо-формалина (в пропорции 1:12), импрегнировали азотнокислым серебром, проявляли в стандартном фотопроявителе и дофиксировали в 10% растворе формалина в течение 12 часов [2]. Импрегнированные серебром препараты аорты подготавливались для исследования методами световой и электронной микроскопии с определением количества межэндотелиальных дефектов и смежности (количество взаимных контактов) из расчета на 100 клеток [14]. Фоторегистрация проводилась цифровым фотоаппаратом Olympus C 180. Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи стандартной программы Statgraph 2.1. Уровень достоверности составлял 0,05 и 0,01.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализы, выполненные через 14 суток моделирования глицероловой ОПН, показали, что у крыс сформировалось острое нарушение выделительной функции почек (табл. 1). Об этом свидетельствовали значительное, почти двукратное, снижение СКФ, гиперкреатининемия (концентрация креатинина превышала показатель интактных животных в среднем в 1,6 раза, $p < 0,05$).

Таблица 1

Влияние введения глицерола на показатели функционального состояния почек при глицероловой модели ОПН у крыс на 14 сутки

Показатель	Контроль (n = 5)	ОПН (n = 9)
Выживаемость, %	100	60
Суточный диурез, мл/100 г	1,7±0,3	5,7±1,1*
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	0,17±0,02	0,08±0,01*
Реабсорбция воды, %	98,5±0,3	95,3±0,6*
Относительный диурез, %	16,6±2,2	34,9±3,5*
Экскреция креатинина, мкмоль/100 г	11,1±1,7	32,5±4,2*
Креатинин крови, мкмоль/л	72,9±4,3	286,0±20,0*

Примечание. Различия достоверны по сравнению между группой контроля и моделью ОПН, $p < 0,05$

Анализ импрегнированных серебром препаратов эндотелия аорты контрольных животных показал, что монослой эндотелия состоит из полигональной формы клеток с узкими межэндотелиальными границами. Иногда по ходу межклеточных границ встречаются мелкие, «пуговичные» образования и большие кольцеобразные структуры, которые по данным литературы определяется как «стигматы» и «кратеры» (Рис. 1) [18].

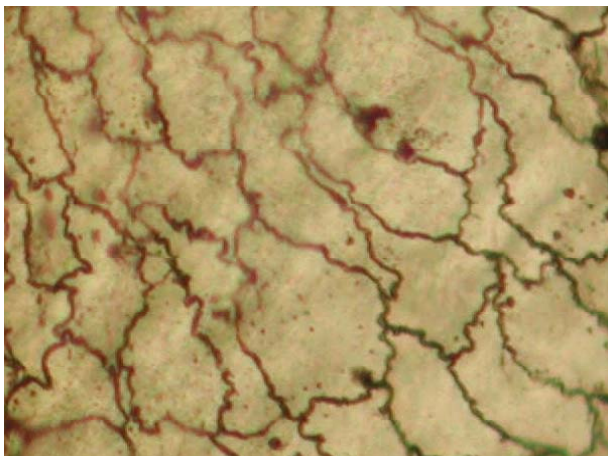


Рис. 1. Стигматы, мелкие аргирофильные пуговчатые образования, кратеры, более крупные, расположены по ходу межэндотелиальных границ. Импрегнация серебром. $\times 400$

В местах гемодинамической травматизации (устья межреберных артерий) встречаются аргирофильные клетки. (Рис. 2).

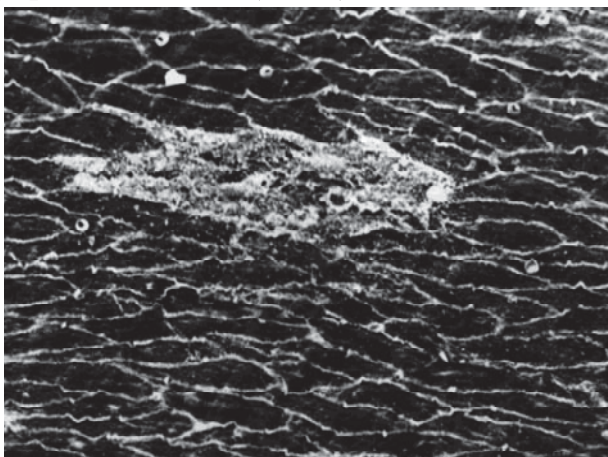


Рис. 2. Группа аргирофильных клеток с повреждениями плазмолеммы в виде округлой формы дефектов. Импрегнация серебром. Растровая электронная микроскопия. $\times 350$.

Таким образом, проведенное морфологическое исследование эндотелия аорты крыс на светооптическом уровне показало, что монослой эндотелия образован однотипными, полигональной формы клетками, с узкими, аргирофильными границами. По ходу их даже у контрольных животных встречаются сквозные межэндотелиальные дефекты в виде стигмат и кратеров. Средний показатель смежности эндотелиоцитов составляет $5,82 \pm 0,15$.

Сравнительный анализ морфологических изменений эндотелия аорты крысы в норме и при моделировании ОПН показывает, что наиболее информативными морфологическими маркерами морфофункционального состояния эндотелия могут быть: количество стигмат, кратеров и смежность эндотелиальных клеток. Первые два параметра (стигматы и кратеры) указывают на степень проницаемости эндотелия в монослое. Смежность эндотелиоцитов, как полагают, является интегральным показателем изменения функциональной и пролиферативной активности клетки [19].

Морфологически эндотелий аорты крысы на 14 сутки ОПН представлен гетерогенными по площади и конфигурации эндотелиальными клетками, которые содержат по ходу межэндотелиальных границ множественные дефекты в виде стигмат и кратеров (Рис. 3).

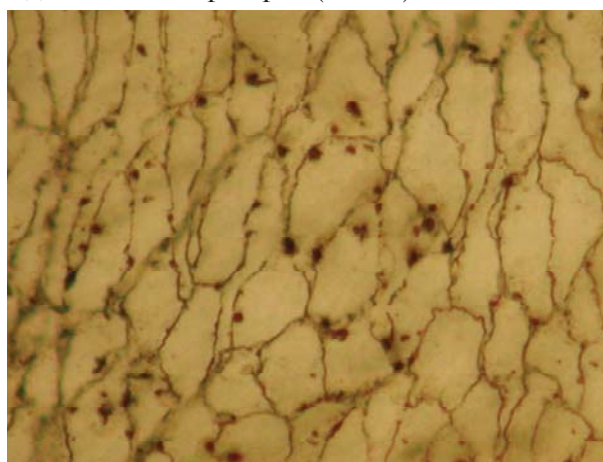


Рис. 3. Большое число стигмат и кратеров по ходу межэндотелиальных границ, импрегнация серебром $\times 400$

У экспериментальных животных отмечается достоверное увеличение количества межэндотелиальных дефектов. Так, количество стигмат было в 3 раза больше, а кратеров в 6 раз больше, чем в группе контроля. (Табл. 2)

Таблица 2

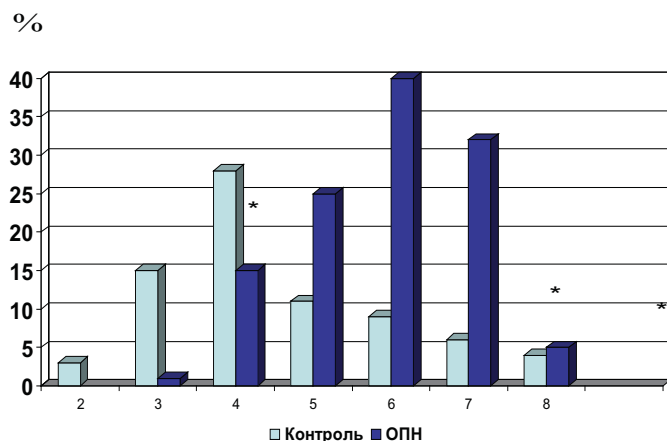
Сравнительный анализ количества межэндотелиальных дефектов в эндотелии аорты крысы в норме и на 14 сутки ОПН (на 100 клеток)

Контроль		ОПН	
стигматы	кратеры	стигматы	кратеры
$18,0 \pm 2,05$	$3,5 \pm 0,58$	$68,0 \pm 5,25^*$	$19,5 \pm 1,03^*$

Примечание: *Различия достоверны по сравнению между группой контроля и моделью ОПН $p < 0,01$

Показатель смежности эндотелиоцитов у животных на 14-е сутки ОПН составлял $6,23 \pm 0,1$, что достоверно выше, чем в норме. Сравнительный анализ распределения эндотелиоцитов по их смежности свидетельствует о том, что с развитием почечной недостаточности

происходит нарушение пролиферативного состояния эндотелия (исчезновение клеток с малой смежностью); рост среднего показателя смежности на 14 сутки ОПН обусловлен увеличением процентного количества эндотелиоцитов со смежностью 6 и 7 (Рис. 4).



При развитии ОПН нарушается пролиферативная способность клеток эндотелия. Отмечается повышение среднего показателя смежности в связи с исчезновением клеток с малой смежностью и увеличением процентного содержания эндотелиоцитов со смежностью 6 и 7.

Рис. 4. Распределение эндотелиоцитов в зависимости от смежности (на 100 клеток).

Обсуждение. Атеросклероз – многоликая болезнь, поражающая различные артериальные участки и связанная с наличием классических факторов риска, среди которых гиперхолестеринемия как первопричина доминирует при ишемической болезни сердца, цереброваскулярной болезни, диабете, курении и болезни периферической артерии. Помимо классических и наследственно детерминированных факторов риска, в настоящее время получены доказательства роли иммунных нарушений, воспалительных заболеваний и хронической болезни почек (ХБП), которые часто являются причиной тяжелой артериальной гипертензии и ускоренного атеросклероза. Учитывая, что ХБП встречается у 10-12% населения, знания о составе, структуре и распространении атеросклеротических поражений – фундаментальная исходная точка для того, чтобы исследовать механизмы развития и предотвратить сердечно-сосудистые осложнения при ХБП. Американская Сердечная Ассоциация суммировала имеющиеся на данный момент времени представления в научной формулировке типов морфологических изменений при атеросклерозе, которые были представлены в виде цифровой классификации типов гистологических поражений [12]. Начальные поражения в слое интимы (I-III тип, от инфильтрации макрофагов и их превращения в пенящиеся клетки к слиянию в липидное ядро) являются незначительными и «немыми», в то время как IV-VI типы поражения могут приводить к клиническим событиям или могут оставаться «немыми», оставляя сосуд проходимым. Самое критическое поражение – VI тип поражений,

где дефекты поверхности эндотелия, гематома и тромбоз образуют бляшку, весьма неустойчивую и опасную как локально, так и системно. Все компоненты этих превращений взаимосвязаны. Так, нарушение целостности эндотелия при VI типе поражений может привести к микрогематоме с формированием или без формирования тромба. Клинические проявления атеросклероза могут появляться уже при IV типе (накопление значительного липидного ядра, превышающего толщину интимы) или V типе поражений (выпирающее в просвет сосудов липидное ядро вместе с фиброзно-мышечным колпачком), когда эти поражения становятся обструктивными. IV-V типы поражения часто превращаются в кальцинированные бляшки (VII тип), и, реже, в преимущественно фиброзные поражения (VIII тип). Вместе с тем, в этой классификации отсутствуют данные о самых ранних структурных изменениях эндотелия при атеросклерозе. В нашей работе было показано, что форма и смежность клеток эндотелия магистральных сосудов изменяется уже на ранних этапах развития болезни почек, при появлении иммунотоксических изменений в организме животных. Это согласуется с результатами Н. А. Колесник и соавт. (2010), которые предполагают единый пусковой механизм повреждения почек и сердечно-сосудистой системы при ХБП [3].

Имеющиеся в настоящее время данные демонстрируют, что атеросклероз является иммунологически опосредованной болезнью. Повреждение эндотелия сопровождается воспалительным ответом, вносящим вклад в обратимые и необратимые изменения в жизнеспособ-

ности тканей и функции органов. Признаны три фактора, вносящие вклад в это повреждение: 1) молекулярный кислород, выделяемый клеточными элементами крови; 2) ферменты, выделяемые форменными элементами крови (особенно нейтрофилами); 3) компоненты активированной системы комплемента. Последние два часто действуют совместно. Эндотелиальный и лейкоцитарный ответы участвуют в повреждении тканей, будучи регулируемым каскадом комплемента [6]. Анафилатоксины и мембранные атакующие комплексы вносят вклад прямо или косвенно в дальнейшее повреждение тканей. Применяемая нами модель была использована для изучения начальных проявлений повреждения эндотелия, так как для ОПН на фоне интоксикации глицеролом характерно быстрое нарастание клинической симптоматики ОПН (анурия, рост креатинина), в основе патогенеза которой лежит способность осмотически активных веществ в высоких дозах вызывать выраженную вазоконстрикцию артериол с развитием ишемии паренхимы почек. Этот сдвиг, по принципу обратной связи запускает регуляторные механизмы почечного кровотока и приводит к падению клубочковой фильтрации и развитию ОПН. В применяемой нами модели нельзя исключить прямое влияние глицерола на сосуды, однако, изменения их строения скорее всего связаны с нарушением взаимодействия форменных элементов крови и эндотелия при ишемии почек. Известно, что у пациентов, перенесших острый гломерулонефрит, риск развития ускоренного атеросклероза значительной выше, чем в общей популяции [15]. По-видимому, нарушения структуры и проницаемости эндотелия в прошлом принимают участие в развитии ранних стадий атеросклероза - активированный эндотелий может способствовать адгезии моноцитов и их миграции в интиму. Координированная экспрессия молекул адгезии: селектинов, интегринов и семейства иммуноглобулинов на поверхности эндотелиальных клеток и моноцитов модулирует эти события [6]. В последующем медиаторы, продуцируемые макрофагами в атеросклеротической бляшке, могут делать поверхность эндотелиальных клеток тромбогенной и приводить к окклюзии сосудов.

ВЫВОДЫ :

1. У крыс с острой почечной недостаточностью по ходу межэндотелиальных границ аорты образуются множественные дефекты в виде стигмат и кратеров, количество которых в несколько раз превышает показатели в группе контроля.
2. С развитием почечной недостаточности у крыс происходит нарушение пролиферативной активности эндотелия с уменьшением количества клеток с малой смежностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берхин Е. Б. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена / Е. Б. Берхин, Ю. И. Иванов - Барнаул : Алтайское книжн. из-во, 1972.- 199 с.
2. Кондаков І. К. Способи оцінки морфофункціонального стану ендотелію. Методичні рекомендації / І. К. Кондаков, А. Ф. Яковцова, О. С. Гавриш // Харків-Київ. - 2000. - 19 с.
3. Колесник М. О. Кардіоваскулярні ускладнення у хворих на хронічну хворобу нирок / М. О. Колесник, І. І. Лапчинська, В. К. Ташук, О. І. Дядик, М. В. Кулизський – Київ.- 2010.- 224 с.
4. Носкова А. П. Влияние фуросемида и маннитола на выживаемость крыс при острой почечной недостаточности // Фармакологическая регуляция функции почек / под ред. А. А. Лебедева. - Куйбышев, 1981.- С. 40-44.
5. Топчий І. І. Нейтрофіли і моноцити при пошкодженні судинистого ендотелію як зв'язки єдиної патогенетическої ланки в розвитку хроніческої болізни почек і атеросклероза / І. І. Топчий // Внутрішня медицина. - 2008. - N 5-6. - С. 51-59.
6. Coresh J. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. / J. Coresh [et al.] // JAMA. - 2007. - V. 298. - P. 2038-2047.
7. Cowie C. C. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults in the US population : National Health And Nutrition Examination Survey 1999-2002 / C.C. Cowie [et al.] // Diabetes Care. - 2006. - V. 29. - P. 1263-1268/
8. Gibson C. M. Association of creatinine and creatinine clearance on presentation in acute myocardial infarction with subsequent mortality / C. M. Gibson [et al.] // J Am Coll Cardiol. - 2003. - V. 42. - P. 1535-1543.
9. Hage F. G. The scope of coronary heart disease in patients with chronic kidney disease / F. G. Hage [et al.] // J Am Coll Cardiol. - 2009. - V. 53. - P. 2129-2140.
10. 11. De Jong P.E. Screening for chronic kidney disease : where does Europe go? / P.E. De Jong [et al.] // Clin J Am Soc Nephrol. - 2008. - V. 3. - P. 616-623.
11. 12. Sary H. C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update / H. C. Sary // Arterioscler Thromb Vasc Biol. - 2000. - V. 20. -P. 1177-1178.
12. 13. Shlipak M. G. Rapid decline of kidney function increases cardiovascular risk in the elderly / M. G. Shlipak // J. Am. Soc. Nephrol. - 2009. - V. 20. - P. 2625-2630.
13. 14. Zand T. Endothelium and "silver Lines". En electron microscopic study / T. Zand // Virchows Arch. (Path.Anat.). - 1982. - V. 395. - P. 133-144.
14. 15. Zoccali C. Renal impairment: a risk factor for ischemic heart disease / C. Zoccali // Curr Opin Pharmacol. - 2006. - V. 6. - P. 221-225.

Надійшла до редакції 17.03.11

Прийнята до друку 25.03.11